

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-370095

(43) 公開日 平成4年(1992)12月22日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 N 9/96

識別記号

庁内整理番号

7823-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平3-147507

(22) 出願日 平成3年(1991)6月19日

(71) 出願人 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

(72) 発明者 荒 勝俊

栃木県小山市中久喜1316-107

(72) 発明者 佐伯 勝久

栃木県河内郡河内町下岡本2415-8-501

(72) 発明者 五十嵐 一暁

栃木県芳賀郡市貝町市塙4594 花王城見寮

D-301

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外2名)

(54) 【発明の名称】 澱粉加水分解酵素の安定化法

(57) 【要約】

【構成】 澱粉加水分解酵素に糖アルコールを添加・混合することにより、澱粉加水分解酵素を安定化する方法。

【効果】 α -アミラーゼ、ブルナーゼ等の澱粉加水分解酵素を、キレート剤及び／又は界面活性剤に対して好適に安定化することができ、洗浄剤中におけるこれらの酵素の失活を防止できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 澱粉加水分解酵素に糖アルコールを添加・混合することを特徴とする澱粉加水分解酵素の安定化法。

【請求項2】 澱粉加水分解酵素が、 α -アミラーゼ及び/又はブルナーゼである請求項1記載の安定化法。

【請求項3】 ブルナーゼが、 α -アミラーゼ活性とブルナーゼ活性の双方を有するものである請求項2記載の安定化法。

【請求項4】 糖アルコールが、ラクチトール、アラビトール、ソルビトール、ガラクトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、エリスリトール、イノシトール、マルチトール、マルトトリイトール、マルトテトライトール及びイソマルチトールから選ばれる少なくとも1種以上である請求項1〜3のいずれかに記載の安定化法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、澱粉加水分解酵素の安定化法、更に詳細には、特に α -アミラーゼ及びブルナーゼに好適な、澱粉加水分解酵素のキレート剤及び/又は界面活性剤に対する安定化法に関する。

【0002】

【従来の技術】澱粉加水分解酵素は、人間の主要なエネルギー源である澱粉の消化に、また澱粉を原料とする水飴、ブドウ糖、異性化糖、更には酒や酢の製造において古くから親しまれかつ利用されてきた酵素である。澱粉加水分解酵素は、各種澱粉質及びその誘導体をグルコース、マルトース又はマルトオリゴ糖にまで分解する酵素系からなり、その作用機構により α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、あるいは枝切り酵素として知られるブルナーゼ、イソアミラーゼ、ネオブルナーゼなどの酵素の総称と理解されている。

【0003】 α -アミラーゼは、ヒト唾液、ブタ唾液、ヒト唾液等の中に存在するほか、アスペルギルス オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、バチルス アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス リケファシエンス (*Bacillus liquefaciens*)、バチルス アミロサッカリティカス (*Bacillus amylosacchariticus*)、バチルス セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス サーキュランズ (*Bacillus circulans*)、バチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、シュウドモナス シュツツツエリ (*Pseudomonas stutzeri*) 等の微生物から生産される。

【0004】 β -アミラーゼは、大麦、小麦等の穀類；ダイズ、インゲンマメ等の豆類；サツマイモ等の各種野菜などの高等植物より多く見出されてきたが、最近バチルス属、シュウドモナス属、ストレプトマイセス属等の微生物から相次いで生産菌が見出されている。

【0005】グルコアミラーゼは、アスペルギルス属、リゾプス属等のカビ類から多く見出されている〔中村道徳監修、「アミラーゼ」、学会出版センター、1986年度刊〕。

【0006】また、枝切り酵素として知られているブルナーゼは、BenderとWallenfels (Biochem. Z., 334, 79(1961)) により、アエロバクター アエロゲネス (*Aerobacter aerogenes*) の一菌株から初めて発見され、その後、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) (J. Jpn. Soc. Starch Sci., 30, 200(1983))、バチルス アシドブルリティカス (*Bacillus acidopullulyticus*) (Agric. Biol. Chem., 52, 2293(1984))、バチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) (Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 24(1983))、ストレプトコッカス ミティス (*Streptococcus mitis*) (Biochem. J., 108, 33(1968))、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) (澱粉科学, 28, 72(1987))、クロストリジウム サーモヒドロスルフリカム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) (Appl. Environ. Microbiol., 49, 5(1985); Biochem. J., 246, 193(1987))、サーマス エスピー (*Thermus* sp.) (J. Jpn. Soc. Starch Sci., 34, 1(1987)) 等の微生物がブルナーゼを生産することが報告されている。

【0007】更に、アミラーゼ活性及びブルナーゼ活性の双方を有する酵素が、バチルスズブチリス (*Bacillus subtilis*) TU (Agric. Biol. Chem., 51, 9(1987); 特公平1-18717号公報) の生産するブルナーゼ-アミラーゼ複合酵素、バチルス サーキュランズ (*Bacillus circulans*) F-2 (Biochim. Biophys. Acta, 99, 1, 188(1989); 特開昭64-60376号公報) の生産するブルナーゼ活性を有するアミラーゼ及びクロストリジウム サーモヒドロスルフリカム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) E-101 (Biochem. J., 246, 193(1987); Biochem. J., 250, 813(1988); J. Gen. Microbiol., 136, 447(1990); 特公昭63-196288号公報) の生産するブルナーゼ/アミラーゼ両活性を有する酵素が報告されている。

【0008】しかし、これらいずれの酵素も、一般的には不安定であり工業的用途を考えると不利な点が多かった。

【0009】一方、近年では、澱粉加水分解酵素はアルカリ洗浄剤組成物の添加成分としての新規用途が注目されており、この目的に適したアルカリ側に至適活性を有する、いわゆるアルカリアミラーゼも見出されている (Agric. Biol. Chem., 35, 11(1971); 特公昭48-4653号公報; 特公昭50-5272号公報; 特公昭55-33309号公報; 特公昭56-10029号公報; 特公昭51-9033号公報; 特公昭52-31949号公報; 特公昭50-5274号公報; 特開昭62-208278号公報)。

【0010】アルカリ側に至適活性を有する澱粉加水分

解酵素生産菌として過去に報告されたものは、バチルス属に属する菌が大半を占め、例えば、バチルス エスピー No. A-40₂ (FERM P-353)、バチルス エスピー No. A-40₃ (FERM P-354)、バチルス エスピー No. A-59 (FERM P-355) [特公昭48-4553号公報]、バチルス エスピー No. 1351 (FERM P-617)、バチルス エスピー No. 169 (FERM P-618) [特公昭50-5272号公報]、バチルス エスピー No. P-203 (FERM P-1366) [特公昭55-3330 9号公報]、バチルス ズブチリス Y08 (ATCC 2155 4)、バチルス ズブチリス Y13 (ATCC 21555) [特公昭56-10029号公報]、バチルス ズブチリス AJ-3255 (FERM P-376)、バチルス ズブチリス AJ-3298 (FERM P-660)、バチルス ズブチリス AJ-3299 (FERM P-6 61) [特公昭51-903号公報]、バチルス オーペンシス エスピー ノブ C-1400 (FERM P-1990) [特公昭52-31949号公報]、バチルス エスピー KSM-1876 (FERM P-10887) [特開平3-87176号公報; 特開平3-87177号公報]、バチルス エスピー KSM-AP1378 (FERM P-1088 6) [特願平1-242605号公報] 等が知られている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これらの菌が生産する澱粉加水分解酵素の多くは界面活性剤、キレート剤等の洗浄剤成分により影響を受け、活性が低下することが知られている。従って、澱粉加水分解酵素をアルカリ洗浄剤の添加成分として用いるには、この活性低下をできるだけ少なくすることが望まれる。この点に鑑み、現在まで種々の安定化法が提案されているが、十分な解決には至っていないのが実情である。

【0012】従って、本発明は澱粉加水分解酵素をこれらの洗浄剤成分に対して好適に安定化する方法を開発することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】かかる実情において、本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、澱粉加水分解酵素を糖アルコールにより処理すると、界面活性剤、キレート剤等の存在下における強い安定化効果が得られることを見出し、本発明を完成した。

【0014】すなわち本発明は、澱粉加水分解酵素に糖アルコールを添加・混合することを特徴とする澱粉加水分解酵素の安定化法を提供するものである。

【0015】本発明の安定化法は、前記のような種々の澱粉加水分解酵素に適用できるが、特に α -アミラーゼ及びブルナーゼに好適に適用することができる。

【0016】本発明に用いられる糖アルコールとしては、ラクチトール、アラビトール、ソルビトール、ガラクトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、エリスリトール、イノシトール、マルチトール、マルトリイトール、マルトテトライトール、イソマルチトール等が挙げられ、特にマルチトール、マルトリイトール及びマルトテトライトールが好ましいものとして

挙げられる。

【0017】糖アルコールの添加量は、適用される澱粉加水分解酵素及び用いる糖アルコールによって異なるが、少なくとも澱粉加水分解酵素の活性中心が保護されるのに必要な量があればよい。例えば、澱粉加水分解酵素を含有する系中に、0.01~10重量%となるように配合するのがよい。

【0018】また、本発明の安定化法を、洗浄剤成分として用いる酵素に適用する場合は、例えば糖アルコールを澱粉加水分解酵素及びその他の洗浄剤成分と混合し、造粒すればよい。

【0019】

【実施例】以下、実施例を挙げて更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0020】参考例

アルカリ α -アミラーゼ活性を有するアルカリブルナーゼY生産菌であるバチルス エスピー KSM-AP1378 (FERM P-10886) を、可溶性澱粉1%、ポリペプトン0.2%、酵母エキス0.1%、 KH_2PO_4 0.03%、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%及び $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0001% (pH 6.5~6.8) を含む培地に接種し、30℃で2日間振とう培養した。この種母培養液を、上記と同様の培地に1%接種し、澱粉加水分解酵素の発酵を行った。なお、培養液のpHをアルカリに保つ目的で、上記培地に別滅菌した Na_2CO_3 を最終濃度で0.5%になるように後添加して培地の調製を行った。培養後、菌体を遠心分離して除き、得られた上清液を粗酵素液とした。更に、通常の方法に従ってエタノール沈殿(75%)を行い、得られた沈殿物を凍結乾燥し、アルカリ α -アミラーゼ活性を有するアルカリブルナーゼY酵素標品を得た。この酵素について、下記の方法により α -アミラーゼ活性及びブルナーゼ活性を測定した。この結果を表1に示す。

【 α -アミラーゼ活性測定法】各種緩衝液に可溶性澱粉(反応系における最終濃度は0.25%)を溶解させた基質溶液0.9mlに、酵素液0.1mlを加え、50℃で15分間反応させた。反応後、3,5-ジニトロサリチル酸(3,5-dinitrosalicylic acid(DNS))法にて還元糖の定量を行った。すなわち、反応液1.0mlにDNS試薬1.0mlを加え、5分間、100℃で加熱発色させ、冷却後、4.0mlの脱イオン水を加えて希釈し、波長535nmで比色定量した。酵素の力価は、1分間に1 μmol のグルコースに相当する還元糖を成する酵素量を1単位(1U)とした。

【ブルナーゼ活性測定法】各種緩衝液中にブルラン(反応系における最終濃度は0.5%)を溶解させた基質溶液0.9mlに、酵素液0.1mlを加え、50℃で15分間反応させた。反応後、DNS法にて還元糖の定量を行った。すなわち、反応液1.0mlにDNS試薬1.0mlを加え、5分間、100℃で加熱発色させ、冷却後、4.0mlの脱イオン水を加えて希釈し、波長535nmで比色定量した。酵素の力価は、

1分間に1 μ molのグルコースに相当する還元糖を成す * 【0021】
 る酵素量を1単位(1U)とした。 * 【表1】

使用菌株	培地1ℓ当たり の酵素量(g)	酵素活性(U/g)	
		ブルナーゼ	α -アミラーゼ
KSM-AP1378	0.2	2230	2680

【0022】実施例2

実施例1で得たアルカリ α -アミラーゼ活性を有するア 10 ※理した。ブルナーゼ活性及び α -アミラーゼ活性につ
 ルカリブルナーゼY溶液に表2に示す糖アルコールを いて、未処理時の酵素活性を100%としたときの処理後
 混合し、25℃、30分間保持した。次いで、各反応液にED の残存活性を表2に示す。
 TAを最終濃度が10mMになるように加え、40℃で60分間処 ※ 【0023】
 理した。 【表2】

糖アルコール	濃度(mM)	残存活性(%)	
		ブルナーゼ	α -アミラーゼ
対照	—	72	27
ラクチトール	10	72	51
アラビトール	20	78	60
ソルビトール	20	79	40
ガラクトース	20	71	53
キシリトール	20	57	55
リビトール	20	92	56
マンニトール	20	78	56
エリスリトール	20	82	43
イノシトール	20	76	72
マルチトール	10	84	95
マルトトリイトール	10	99	87
マルトテトライトール	10	104	138
イソマルチトール	10	79	58

【0024】実施例3

市販の α -アミラーゼ(シグマ社製, *Bacillus lichenif* 30 ★15分間処理した。 α -アミラーゼ活性について、未処理
*ormis*由来 α -アミラーゼ) 0.5 μ gと表3に示す糖アルコ 時の酵素活性を100%としたときの処理後の残存活性を
 ールを、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7) 0.5ml中で混合 表3に示す。
 し、25℃、30分間保持した。次いで、各反応液に各種界 【0025】
 面活性剤を最終濃度が0.05%になるように加え、40℃で★ 【表3】

糖アルコール	濃度(mM)	α -アミラーゼ残存活性(%)		
		LAS ^{*1}	ES ^{*2}	SAS ^{*3}
対照	—	82	50	31
マルチトール	20	107	68	71
イノシトール	20	104	58	39
キシリトール	20	104	55	35

- *1: 線状アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
 *2: ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム塩
 *3: アルキルスルホン酸ナトリウム

【0026】実施例4

市販のブルナーゼ(シグマ社製, *Enterobacter aerog*
*enes*由来ブルナーゼ) 0.01gと表4に示す糖アルコ
 ールを混合し、25℃、30分間保持した。次いで、各反応液
 に各種界面活性剤を最終濃度が0.05%になるように加

え、40℃で15分間処理した。ブルナーゼ活性につい
 て、未処理時の酵素活性を100%としたときの処理後の
 残存活性を表4に示す。

【0027】

【表4】

7

8

糖アルコール	濃度(mM)	ブルナーゼ残存活性(%)		
		LAS ^{*1}	ES ^{*2}	SAS ^{*3}
対照	—	0	86	80
マルチトール	20	106	97	94
イノシトール	20	97	97	83
リビトール	20	55	81	81
アラビトール	20	42	88	90

*1: 線状アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム

*2: ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム塩

*3: アルキルスルホン酸ナトリウム

【0028】

【発明の効果】 以上のように、本発明の安定化法によれば、 α -アミラーゼ、ブルナーゼ等の澱粉加水分解酵

素をキレート剤及び／又は界面活性剤等に対して好適に安定化することができ、洗浄剤中におけるこれらの酵素の失活を防止することができる。